

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**



## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **62000288 A**(43) Date of publication of application: **06 . 01 . 87**

(51) Int. Cl

**C12P 13/04**  
**C12P 13/06**  
**C12P 13/08**  
**C12P 13/22**  
**C12P 13/24**(21) Application number: **61009008**(22) Date of filing: **21 . 01 . 86**(30) Priority: **09 . 03 . 85 JP 60 45761**(71) Applicant: **SANRAKU INC**(72) Inventor:  
**AIBA SHUICHI**  
**AZUMA SHOJI**  
**SONODA TAKESHI**  
**UEDA WATARU**  
**TSUNEKAWA HIROSHI**  
**KUWAJIMA TAKESHI**  
**OKAMOTO ROKURO**  
**ISHIKURA TOMOYUKI****(54) PRODUCTION OF L-AMINO ACID BY  
FERMENTATION METHOD**

(57) Abstract:

**PURPOSE:** In producing an L-amino acid by fermentation method, to obtain in high yield the L-amino acid, by continuing fermentation while crystallizing the L-amino acid accumulated in the culture solution.

**CONSTITUTION:** In producing an L-amino acid such as tryptophan, tyrosine, leucine, etc., by fermentation method, a surface active agent such as nonionic surface active agent of polyoxyethylene polypropylene ether type is added to a culture solution and the fermentation is continued while crystallizing the L-amino acid formed and accumulated in the culture solution.

**COPYRIGHT: (C)1987,JPO&Japio**

## ⑫ 公開特許公報(A)

昭62-288

⑪ Int. Cl.<sup>4</sup>C 12 P 13/04  
13/06

識別記号

庁内整理番号

8213-4B  
B-8213-4B  
C-8213-4B  
D-8213-4B

⑬ 公開 昭和62年(1987)1月6日

※審査請求 未請求 発明の数 1 (全5頁)

⑭ 発明の名称 発酵法によるL-アミノ酸の製造方法

⑮ 特 願 昭61-9008

⑯ 出 願 昭61(1986)1月21日

優先権主張

⑰ 昭60(1985)3月9日 ⑱ 日本(JP) ⑲ 特願 昭60-45761

⑳ 発 明 者	合 葉	修 一	吹田市山田西3丁目21, A712
㉑ 発 明 者	東	正 二	藤沢市羽鳥3丁目13~1~203
㉒ 発 明 者	園 田	毅	町田市森野2-4-17 田中マンション107
㉓ 発 明 者	上 田	涉	神奈川県中郡大磯町大磯703
㉔ 発 明 者	恒 川	博	藤沢市羽鳥3丁目9番の31
㉕ 発 明 者	桑 島	威	藤沢市鵠沼海岸5-9-34
㉖ 発 明 者	岡 本	六 郎	藤沢市藤沢5437
㉗ 発 明 者	石 倉	知 之	茅ヶ崎市小和田1-22-32
㉘ 出 願 人	三 榮 株 式 会 社		東京都中央区京橋1丁目15番1号

最終頁に続く

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

発酵法によるL-アミノ酸の製造方法

## 2. 特許請求の範囲

1. 発酵法によりL-アミノ酸を製造するに際し、培養液中に蓄積するL-アミノ酸を晶析せしめながら発酵を継続することを特徴とするL-アミノ酸の製造方法。

2. L-アミノ酸を晶析せしめる手段が培養液中に界面活性剤を添加することからなる特許請求の範囲第1項記載のL-アミノ酸の製造方法。

3. L-アミノ酸がトリプトファン、チロシン、ロイシン、イソロイシン、フェニルアラニン、ヒステジン、スレオニン、セリン、バリンから選ばれる1又は2以上のアミノ酸である特許請求の範囲第1項又は第2項記載のL-アミノ酸の製造方法。

4. 界面活性剤がポリオキシエチレンポリオキシプロピレンエーテル系の非イオン性界面活性剤である特許請求の範囲第1項から第3項のいずれ

かに記載のL-アミノ酸の製造方法。

## 3. 発明の詳細な説明

## 産業上の利用分野

本発明は発酵法によるL-アミノ酸の製造法に関し、更に詳しくは、該製造法における増収方法に関する。

## 従来の技術

各種のL-アミノ酸が発酵法によって製造されているが、数種のものを除いて必ずしも満足すべき収量での生産が行われているとはいえない。例えば、必須アミノ酸として各種の分野で需要の増大が期待されているL-トリプトファン(以下「Trp」と略記する)の発酵による製造方法は、アプレバクテリウム属、コリネバクテリウム属、バチルス属、エッシエリヒア属等に属する微生物を栄養培地に培養し、蓄積するL-トリプトファン(以下、「Trp」と略記する)を分離回収する方法が知られていて、更に、これらの生産性を高めるために、Trp生成に関与する遺伝子を含むDNA断片とベクターDNAとの組換え体DNAで形質

転換した微生物等を用いる方法が各種薬剤耐性変異菌株を用いる方法とともに提案されている（例えば、特開昭57-803985号、特開昭59-120091号、特開昭59-156292号公報参照）。

また、その他のアミノ酸についても同様の試みがなされている（例えば、特開昭57-186496号（スレオニン）、同昭58-893号（イソロイシン）、同昭58-134994号（フェニルアラニン）等）。

#### 発明が解決しようとする問題点

上述の如く、Trpをはじめとして、各種アミノ酸の生産性を高める目的で各種の生産菌が提案されているが、いまだに一部のアミノ酸を除いて、工業的製造法として、満足できる生産性を実現したものは見い出せない。一方、本発明者らは、種種の微生物の培養によるTrpの生産性について検討したところ、培養液中のTrpの蓄積濃度がある程度以上に高まると、その生産能が低下してくるを見い出した。そこで、本発明者らは、発酵法によるTrpの生産性を高めるために、単に生産

ノ酸を高い収率で製造できるものである。

本発明にいうL-アミノ酸とは、発酵生産に際し、培養液中の蓄積量がある程度高まり、生産性に障害を与える可能性のあるアミノ酸であれば、その種類を問わず包含されるものである。より好適には比較的水溶性の低いアミノ酸であって、例えば、トリプトファン、チロシン、ロイシン、イソロイシン、フェニルアラニン、ヒスチジン、スレオニン、バリン等がその具体的なものとして挙げられる。

なお、本発明の効果を奏するL-アミノ酸の蓄積量は、対象となるアミノ酸の種類、栄養培地組成、培養濃度等によって変動するため臨界的でないが、一般に、約5g/l以上に達するものであればよい。

次に、培養液中に蓄積するアミノ酸を晶析せしめる方法としては、生産菌の生理活性に悪影響を与えないものであれば、それが、物理的方法であるか化学的方法であるかを問わず用いることができる。例えば、培養液中に、生成アミノ酸の晶析

菌の変異等によるだけでなく、微生物の培養条件とTrpの生産性の関連について研究したところ、培養液中に蓄積するTrpを晶析させることにより発酵培養液からTrpを発酵系外に除去せしめれば、Trpの蓄積による、その生産能の劣化を防ぐことができることを見い出した。そして、この現象はTrp以外の発酵法により生産される他のアミノ酸の製造方法にも応用できることを確認し本発明を完成した。

#### 問題点を解決するための手段

しかして、本発明は、発酵法によりL-アミノ酸を製造するに際し、培養液中に蓄積するL-アミノ酸を晶析せしめながら発酵を継続することを特徴とするL-アミノ酸の製造方法を提供するものである。即ち、本発明は、発酵法によりL-アミノ酸を製造するに際し、培養液中に蓄積する該アミノ酸を晶析せしめることにより、培養液中のL-アミノ酸の濃度を一定量以下に維持できるため、それらの高濃度蓄積による生産性の阻害発現を回避できる。したがって、目的とするL-アミ

ノ酸を高い収率で製造できるものである。を促進せしめる効果を有する物質を添加するか、培養温度、培養pH等を調整する方法を挙げることができる。かかるアミノ酸の晶析を促進せしめる効果を有する物質の具体的なものとしては、生産するアミノ酸そのものを種結晶として用いるか、通常発酵において、消泡剤として使用される界面活性剤を添加するのが効果的である。就中、界面活性剤の添加は、それが、培養液中の各種組成物の凝集等に作用し、培養液中のアミノ酸の溶解度を低下せしめる効果を発揮するために、各種アミノ酸を効率よく晶析できる。そして、晶析効果のある界面活性剤の具体的なものとしては、非イオン性界面活性剤に属するものであって、例えばトリトンX-100（ローム・アンド・ハース社製）、ブルロニックL-61（旭電化工業社製）アデカノールLG126（同前）、ニッサンノニオン（日本油脂工業社製）、ダウDKXI-038A（ダウコーニング社製）等を好適なものとして挙げることができる。

次に、界面活性剤は培養全期間中、何時添加し

てもよいが、一般に、固体の対数増殖後期に添加するのが好ましい。そして、その添加量は界面活性剤の種類によって異なるので臨界的でないが、通常、培養液量に対して、消泡剤としての約10倍量、具体的には約0.2~1.0 (v/v) 多となるように定めることができる。

以上により、培養液中のアミノ酸の蓄積濃度を一定量以下に抑制することができるため、生成アミノ酸自体によるその生産性の阻害、物質移動に与える悪影響等を軽減でき、最終的に単位培養液量当りの各アミノ酸の蓄積量を飛躍的に高めることができる。

かくして、蓄積するアミノ酸は、それ自体公知の分離精製法によって、培養物中より単離できる。

以下本発明を実施例によって更に具体的に説明する。

#### 実施例1 Trpの添加、並びに培養温度及び培養pHの調整による、Trpの晶析を用いる方法

種母培地に、33.5℃18時間培養した E. coli (ATCC 31743) を4多3.0 l ジャーファー

酵母エキス	5 g/l
NaCl	5 g/l
テトラサイクリン	10 mg/l pH 7.0

#### 生産培地

グルコース	40 g/l (添加液)
カザミノ酸	20 g/l 20w/v多アントラニル酸溶液
硫酸アンモニウム	10 g/l 20w/v多グルコース溶液
リン酸-カリウム	2 g/l を連続供給した。
硫酸マグネシウム	1 g/l
酵母エキス	1 g/l
アントラニル酸	0.5 g/l
炭酸カルシウム	3 g/l
硫酸、第一鉄	20 mg/l
テトラサイクリン	10 mg/l pH 7.0

#### 実施例2 界面活性剤の添加によるTrp晶析法の適用

実施例1と同様に E. coli (ATCC 31743) の菌体を増殖させた後、20 w/v多アントラニル酸及び50 w/v多のグルコースを連続供給しつつ培養を続行した。培養途中(培養52時間目)に、界面活

メンターに接種し、培養温度30℃通気量0.5 V.V.M. pH 6.8~7.1の範囲にアンモニア水にて調整し、菌体を増殖させた。以後20 w/v多、アントラニル酸50 w/v多、グルコースを連続供給しつつ培養を続行した。培養途中(培養76時間目)に、L-トリプトファン29.6 g/lの時期に、L-トリプトファン結晶を1 g/lになるよう添加し、培養温度を25℃、pHを6.0迄下げ、1時間その状態を保った後、元の培養温度pHに戻した。その結果、L-トリプトファンの結晶が析出しはじめ、培養液中のL-トリプトファン濃度は22.7 g/l迄低下し、L-トリプトファンの生成量は100時間目に39.5 g/lに達した(なお、培養途中でL-トリプトファンの添加、培養温度、pHの変化を行わないで培養を継続した場合のL-トリプトファンの生成量は31.4 g/lであった)。L-トリプトファンの分析はキサンチドロール法、TLC法によった。

#### 種母培地

ペプトトリプトン	10 g/l
----------	--------

性剤ブルロニックL-61を1多を添加すると、トリプトファン生成濃度25 g/lにてL-トリプトファンの結晶が析出しはじめ、以後もL-トリプトファンの生成も続き培養120時間目に、40.3 g/lのL-トリプトファンを生成・蓄積した。なお、この時培養液中のL-トリプトファン濃度は、19.1 g/lであった。種母培地、生産培地は、実施例1と同様である。

#### 実施例3 L-チロシンの製造方法

L-チロシン生産菌(ATCC 21568株)を、グルコース1多、ペプトン1多、酵母エキス1多、NaCl 0.3多の組成の種母培地で30℃で24時間培養した前培養液300 mlを、10 lの生産培地を含む30 l容量のジャーファーメンターに接種して、培養温度30℃通気量0.5 V.V.M. pH 7.0~7.2の範囲にアンモニア水にて調整し、菌体を増殖させた。以後50 w/v多、グルコースを連続供給しつつ培養を続行した。培養途中(培養48時間目)に、界面活性剤ブルロニックL-61を1多添加すると、L-チロシン生成濃度4.8 g/lに

てL-チロシンの結晶が析出しはじめ、以後もL-チロシンの生成が続き、培養84時間目に8.7g/lのL-チロシンを生成・蓄積した。なお、この時培養液中のL-チロシン濃度は2.3g/lであった。また、培養途中でブルロニックL-61を添加せずに培養を継続した場合のL-チロシン生成量は6.0g/lであった。

#### 種母培地

グルコース	2%
ペプトン	1%
酵母エキス	1%
NaCl	0.3% pH7.2

#### 生産培地

グルコース	5%
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.05%
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.05%
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.025%
硫酸アンモニウム	2%
NZ-アミン	0.5%
ビオチン	30 μg/l pH7.2

#### 生産培地

グルコース	5%
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2%
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.15
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.05
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.02
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.002
ビオチン	30 μg/l
肉エキス	0.4%
ペプトン	1%
ビロキサンチン	50 μg/l pH6.6

#### 実施例4 L-ロイシンの製造方法

L-ロイシン生産菌(ATCC 21308株)を、グルコース1%、ペプトン1%、酵母エキス1%、NaCl 0.3%の組成の種母培地で30℃で24時間培養した前培養液300mlを10lの生産培地を含む30l容量のジャーファーマンターに接種して、培養温度32℃、通気量0.5 V.V.m.、攪拌数500 rpm、pH 6.5～6.6の範囲にアンモニア水にて調整し、菌体を増殖させた。以後50 ml/hグルコースを連続供給しつつ培養を続行した。培養24時間目に攪拌数を400 rpmとし、48時間目に界面活性剤ブルロニックL-61を1%添加すると、L-ロイシン生成濃度27.6g/lにてL-ロイシンの結晶が析出しはじめ、以後もL-チロシンの生成が続き培養72時間目に37.8g/lのL-ロイシンを生成・蓄積した。なお、この時、培養液中のL-ロイシン濃度は、25.8g/lであった。また培養途中でブルロニックL-61を添加せずに培養を継続した場合のL-ロイシン生成量は31.4g/lであった。

特許出人 三 榮 株 式 会 社

第1頁の続き

⑤Int.Cl.

C 12 P 13/08

13/22

13/24

識別記号

庁内整理番号

C-8213-4B

D-8213-4B

A-8213-4B

B-8213-4B

C-8213-4B

C-8213-4B